










**VESSEL FOR BLOOD SAMPLING****Publication number:** WO0009746**Publication date:** 2000-02-24**Inventor:** HELFTENBEIN ELKE (DE)**Applicant:** ANTIGEN GMBH (DE); GREINER LABORTECHNIK GMBH (AT); HELFTENBEIN ELKE (DE)**Classification:****- international:** **G01N33/48; C12M1/34; C12N15/10; C12Q1/68; G01N33/48; C12M1/34; C12N15/10; C12Q1/68;** (IPC1-7): C12Q1/68; A61B5/15**- European:** C12N15/10A; C12Q1/68A4**Application number:** WO1999EP05857 19990812**Priority number(s):** DE19981036559 19980812**Also published as:** EP1105533 (A1)  
 US6776959 (B1)  
 ZA200102036 (A)  
 EP1105533 (A0)  
 DE19836559 (A1)

more &gt;&gt;

**Cited documents:** EP0818542  
 EP0554034  
 XP002900733  
 XP002900734

Report a data error here

**Abstract of WO0009746**

The present invention relates to a vessel for blood sampling that contains a solution comprising a guanidium salt, a buffer substance, a reduction agent and/or a detergent. This vessel can especially be used in blood sampling for detecting nucleic acids.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C12Q 1/68, A61B 5/15</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/09746</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Februar 2000 (24.02.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05857</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. August 1999 (12.08.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 36 559.4 12. August 1998 (12.08.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ANTI-GEN GMBH [DE/DE]; Max-Lang-Strasse 58, D-70771 Leinfelden (DE). GREINER LABORTECHNIK GMBH [AT/AT]; Bad Haller Strasse 32, A-4550 Kremsmünster (AT).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HELFTENBEIN, Elke [DE/DE]; Leonorenstrasse 7, D-70597 Stuttgart (DE).</p> <p>(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR &amp; SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: VESSEL FOR BLOOD SAMPLING</p> <p>(54) Bezeichnung: GEFÄSS ZUR ENTNAHME VON BLUT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The present invention relates to a vessel for blood sampling that contains a solution comprising a guanidium salt, a buffer substance, a reduction agent and/or a detergent. This vessel can especially be used in blood sampling for detecting nucleic acids.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Gefäß zur Blutentnahme, das eine Lösung enthält, die als Bestandteile ein Guanidiniumsalz, eine Puffersubstanz, ein Reduktionsmittel und/oder ein Detergenz umfaßt. Das Gefäß ist besonders geeignet zur Entnahme von Blut, das auf Nukleinsäuren hin untersucht werden soll.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Gefäß zur Entnahme von Blut

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Gefäß zur Entnahme von Blut, wobei das entnommene Blut insbesondere zur Nukleinsäurestabilisierung und -analytik eingesetzt werden soll.

Während der Abnahme wird Blut herkömmlicherweise in Gefäßen aufgefangen, die bereits Antikoagulantien wie z.B. Heparin, Citrat oder EDTA enthalten. So wird verhindert, daß das Blut gerinnt. So gewonnene Blutproben lassen sich längere Zeit bei geeigneten Temperaturen lagern. Diese Art der Blutgewinnung hat jedoch erhebliche Nachteile, wenn Nukleinsäuren, wie z.B. (m)RNA oder DNA analysiert werden sollen. Für solche Zwecke sollten die Nukleinsäuren, die in der Probe enthalten sind, am besten bereits im Moment der Abnahme stabilisiert werden, d.h. es sollte der Abbau der vorhandenen Nukleinsäuren, aber auch die Neusynthese von mRNA verhindert werden.

Dieses Ziel der stabilen Lagerung der im Probenmaterial enthaltenen Nukleinsäuren vom Moment der Abnahme an ist bei der Lagerung von Blut aus folgenden Gründen bis jetzt praktisch nicht zu bewerkstelligen:

Zellen enthalten Nukleasen, Enzyme, die Nukleinsäuren zerstören, sobald sie mit ihren Substraten (RNA, DNA) in Kontakt kommen. Die Wirkung zellulärer und extrazellulärer Nukleasen ist normalerweise unter physiologischer Kontrolle, solange die Zellen in ihrer normalen Umgebung sind. Die Entnahme von Blut führt zu mehr oder weniger starken Veränderungen der in den Zellen enthaltenen Nukleinsäuren. Nukleasen werden dann innerhalb der Zellen und/oder durch die Lyse von Zellen nach außen freigesetzt.

Außerdem werden Nukleinsäuren mehr oder weniger stark synthetisiert. Gerade die Langzeitlagerung von Blut führt zur Alterung und Zerstörung der Zellen.

Ein weiteres Problem bei der Langzeitlagerung von Blutproben, die nach herkömmlichen Abnahmeverfahren gewonnen wurden, ist die starke Veränderung des Probenmaterials. Solche Veränderungen wie z.B. starke Lyse von Zellen, können dazu führen, daß die Standardverfahren der Nukleinsäureisolierung nicht mehr mit befriedigender Effizienz funktionieren.

Abgesehen von den Problemen einer stabilen Lagerung von Nukleinsäuren, die im Probenmaterial enthalten sind, ergeben sich beim herkömmlichen Verfahren der Blutentnahme weitere Schwierigkeiten. Die herkömmlichen Antikoagulantien werden oft bei der Nukleinsäureisolierung nicht mit genügender Effizienz abgetrennt und stören bei der nachfolgenden Nukleinsäureanalytik, wie z.B. bei der Amplifikation mittels PCR (Polymerase Chain Reaction). Heparin ist z.B. ein allgemein bekannter Inhibitor der PCR.

Schließlich ergibt sich bei der quantitativen Nukleinsäureanalytik die Frage, wie das gesamte Verfahren von der Probennahme bis hin zur Nukleinsäuremessung unter standardisierten Bedingungen kontrolliert werden kann. Idealerweise sollte dem Probenmaterial bereits bei der Entnahme eine bezüglich Menge und Qualität definierte Standardnukleinsäure zugesetzt werden, die dem gesamten Prozeß der Probennahme und Bestimmung unterzogen wird. Auch dies ist mit den herkömmlichen Abnahmesystemen nicht zu bewerkstelligen.

Ein weiterer Nachteil der konventionellen Blutentnahme ist die Gefahr der Übertragung von infektiösem Material, da bisher für die Nukleinsäureisolierung manuelle Verfahrensschritte notwendig sind. Ein Kontakt mit potentiell infektiösen Erregern kann nicht ausgeschlossen werden.

In der Literatur ist ein Verfahren beschrieben, bei dem die Blutprobe unmittelbar nach der Abnahme vom Patienten mit Guanidiniumsalz vermischt wird (EP 0 818 542 A1). Bei diesem Verfahren liegt das Guanidiniumsalz in Pulverform vor, um somit die höhere Stabilität des Guanidiniumsalzes zu nutzen. Dieses Verfahren besitzt jedoch gravierende Nachteile, da sich das Salz z.B. zunächst in dem zugegebenen Blut lösen muß. Der Lösungsvorgang ist insbesondere temperaturabhängig und aufgrund des verwendeten, undurchsichtigen Probenmaterials nicht zu kontrollieren. Die Verwendung eines entsprechenden Produktes für diagnostisch-medizinische Zwecke ist somit äußerst problematisch.

Ferner sind Nukleasen äußerst aktive Enzyme, die nur unter extrem denaturierenden Bedingungen zu inhibieren sind. Die Denaturierung ist abhängig von der Konzentration

des Guanidiniumsalzes in Lösung. Eine inhibierende Konzentration von Guanidiniumsalz in Lösung ist bei dem zitierten Verfahren nicht von Anfang an gegeben. Es kommt also zum unkontrollierten Abbau von Nukleinsäuren während des Lösungsvorgangs. Bei diesem Verfahren wird außerdem auf den Zusatz von reduzierenden Agenzien verzichtet, ohne die eine wirksame Inhibition - insbesondere von RNasen - nicht gewährleistet ist (siehe Beispiel Nr. 5).

Die so hergestellte Probe kann außerdem nicht direkt für die weitere Nukleinsäureisolierung an Glasoberflächen verwendet werden. Die Verwendung von Guanidiniumsalzpulver erlaubt außerdem nicht den Zusatz von internen Nukleinsäurestandards. Solche Standards sind zur Verfahrenskontrolle und genauen Quantifizierung unerlässlich.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, ein Gefäß zur Blutentnahme anzugeben, das die Nachteile aus dem Stand der Technik nicht aufweist. Insbesondere soll die mit dem Gefäß entnommene Probe direkt den gängigen Nukleinsäureanalyseverfahren zugeführt werden können, ohne weitere Probenaufbereitungsschritte durchführen zu müssen.

Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Gefäß zur Entnahme von Blut, enthaltend eine wäßrige Lösung mit folgenden Bestandteilen:

- ein Guanidiniumsalz;
- eine Puffersubstanz;
- ein Reduktionsmittel und/oder
- ein Detergenz.

Das erfindungsgemäße Gefäß besitzt folgende Vorteile: 1. Das Blut wird bereits im Moment der Abnahme lysiert, indem das Abnahmegefäß bereits eine Nukleinsäure-stabilisierende Substanz in Lösung enthält. 2. Die Nukleinsäure-stabilisierende Substanz ist so zusammengesetzt, daß das Probenmaterial, insbesondere die darin enthaltenen Nukleinsäuren unmittelbar nach Kontakt mit der Lösung stabilisiert werden. 3. Die stabilisierte Probe muß, im Gegensatz zu allen bisher üblichen

Abnahmesystemen wie EDTA- oder heparinhaltigen Abnahmegefäßen, nicht länger als infektiöses Material gehandhabt werden. 4. Die Nukleinsäure-stabilisierende Substanz ist so zusammengesetzt, daß das Probenmaterial direkt in nachfolgenden Isolierungsverfahren verwendet werden kann. 5. Die Nukleinsäure-stabilisierende Substanz kann bei der nachfolgenden Isolierung so effizient abgetrennt werden, daß eine Hemmung der PCR nicht auftritt. 6. Der Nukleinsäure-stabilisierenden Substanz kann ein interner Standard zugesetzt werden. Dieser erlaubt die Kontrolle des gesamten Verfahrens von der Probenentnahme bis hin zur Nukleinsäuredetektion.

Das in Punkt 1 genannte Abnahmegefäß besteht aus einem herkömmlichen Blutentnahmegefäß (Röhrchen), in das ein definiertes Volumen einer Nukleinsäure-stabilisierenden Substanz gegeben wird. Das Röhrchen wird anschließend vorzugsweise mit einem definierten Unterdruck versehen, der garantiert, daß nur ein bestimmtes Volumen Blut während der Abnahme zufließen kann. Das Röhrchen kann mit konventionellen Methoden der Blutabnahme gehandhabt werden. Die in dem Röhrchen enthaltene Lösung enthält in ihrer speziellen bevorzugten Ausführungsform folgende Reagenzien : Guanidiniumthiocyanat, Triton-X-100, Dithiothreitol und ein geeignetes Puffersystem wie z.B. Citrat, Tris oder Hepes. In der beschriebenen Zusammensetzung ist die Lösung kompatibel mit dem Vakuumröhrchen. Diese Lösung kann problemlos in dem Vakuumröhrchen gelagert werden, ohne daß es zu einer Beeinträchtigung der gewünschten stabilisierenden Funktion kommt. Das gesamte System ist insbesondere für den Blutspender problemlos und sicher bei der Probennahme.

Die Lösung, enthaltend das Guanidiniumsalz, die Puffersubstanz, das Reduktionsmittel und/oder das Detergenz ist lagerungsstabil und verwandelt das zugeführte, frisch entnommene Blut in ein Material, das ebenfalls lagerungsstabil ist und das den gängigen Nukleinsäureanalysekits (wie z.B. von Roche oder Qiagen) unmittelbar zugeführt werden kann.

Als Guanidiniumsalz sind Guanidiniumthiocyanat und/oder Guanidiniumchlorid bevorzugt.

Vorzugsweise liegt das Guanidiniumsalz in einer Konzentration von 2,0 bis 8,0 M vor. Als Puffersubstanz ist Tris oder Citrat bevorzugt, wobei der exakte pH vorzugsweise mit HCl eingestellt wird. Weitere mögliche Puffer sind jedoch HEPES, MOPS, Citrat- und Phosphatpuffer, wie z.B. PBS.

Die Pufferkonzentration liegt vorzugsweise zwischen 10 und 300 mM, besonders bevorzugt zwischen 10 und 100 mM.

Als Detergenz ist Triton-X-100 bevorzugt. Weitere mögliche Detergenzien sind NP-40, Tween 20, Polydocanol oder andere Detergenzien.

Die Detergenzkonzentration liegt vorzugsweise bei 5 bis 30 % (w/v), besonders bevorzugt bei 10 bis 20 % (w/v).

Als Reduktionsmittel ist DTT bevorzugt, wobei jedoch auch  $\beta$ -Mercaptoethanol, TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphin) oder andere Reduktionsmittel einsetzbar sind.

Die bevorzugte Konzentration des Reduktionsmittels liegt bei 0,1 bis 10 % (w/v); besonders bevorzugt sind 0,5 bis 2 % (w/v).

Der pH der Lösung liegt vorzugsweise bei 3,0 bis 9,0, besonders bevorzugt bei 4,0 bis 7,5, besonders bevorzugt bei 5 bis 6.

Der pH der Lösung wird insbesondere so gewählt, daß sich nach Zugabe des Probenmaterials ein pH-Wert im Bereich von 5,0 bis 7,6 einstellt. Besonders bevorzugt ist ein pH zwischen 6,3 und 6,9 (siehe Beispiel Nr. 8)

Eine besonders bevorzugte Lösung enthält vorzugsweise 4 M Guanidiniumthiocyanat, 45 mM Tris/HCl, 18, vorzugsweise 15 % (w/v) Triton-X-100, 0,8% (w/v) DTT und besitzt einen pH von 6,0.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das Volumen zur Aufnahme der Blutprobe einen Unterdruck auf, der so eingestellt werden kann, das ein vorab bestimmtes Blutvolumen in das Gefäß eingesaugt wird, nachdem ein Blutgefäß angestochen wurde. Entsprechend evakuierte Gefäße sind auf dem Markt erhältlich.



Das Gefäß, enthaltend das entnommene Blut, kann dann sofort der weiteren Analytik zugeführt werden oder aber für einen längeren Zeitraum (bis mehrere Tage) ohne Nachteile für die Qualität der Probe aufbewahrt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das frisch entnommene Blut direkt in dem Blutentnahmegefäß mit der oben beschriebenen Lösung in Kontakt gebracht, so daß sofort sämtliche Vorgänge, die das Nukleinsäuremuster der Probe verändern können, gestoppt werden. Die später ermittelten Daten hinsichtlich der nachgewiesenen Nukleinsäuren stellen daher sehr genau den Ist-Zustand zum Zeitpunkt der Blutentnahme dar, sowohl hinsichtlich der Mengen als auch der Arten der Nukleinsäuren.

Vorzugsweise entspricht die entnommene Blutmenge dem 0,1- bis 4-fachen der in dem Gefäß vorgelegten Lösung. Letztere beträgt vorzugsweise 0,5 bis 5,0 ml. Somit liegt die Endkonzentration an Guanidiniumsalz nach Blutzusatz bei 1,0 bis 5 M, vorzugsweise bei 1 bis 3 M, besonders bevorzugt sind 2-3 M (siehe Bsp. 7).

Das erfindungsgemäße Gefäß wird vorzugsweise dann zur Blutentnahme eingesetzt, wenn die Blutprobe für die Nukleinsäureanalytik verwendet werden soll.

Die Verwendung o.g. Lösung als Bestandteil des beschriebenen Abnahmesystems garantiert allein die sofortige Lyse der Zellen und simultane Stabilisierung der Probe durch unmittelbare Inaktivierung der Nukleasen. Überraschenderweise kann die so gewonnene Blutprobe selbst bei Raumtemperatur oder höher über mehrere Tage gelagert werden. Das Abnahmesystem gewährleistet außerdem eine kontaminationssichere und nicht-infektiöse Handhabung von der Probennahme über die Nukleinsäureisolierung bis hin zur Analytik. Bei den herkömmlichen Verfahren der Nukleinsäureisolierung sind bisher immer zusätzliche Handhabungsschritte (wie die Überführung der entnommenen Blutprobe in die Reagenzien zur Nukleinsäureisolierung usw.) notwendig, die mit einem zusätzlichen Infektionsrisiko verbunden sind.

Die mit dem Blutentnahmesystem gewonnene Probe ist kompatibel mit allen gängigen Standardverfahren der Nukleinsäureisolierung. In diesem Zusammenhang besonders hervorzuheben sind Verfahren, die auf der Bindung von Nukleinsäuren an Glasoberflächen basieren, aber auch sequenzspezifisches Binden an komplementäre Nukleinsäure und Lösungsmittel-basierende Extraktionsverfahren.

Die beschriebene Erfindung besteht somit aus einem Blutentnahmesystem, das so konzipiert ist, daß folgende Bedingungen erfüllt werden: 1. Kontrollierte Probenentnahme und gleichzeitige Stabilisierung der im Probenmaterial enthaltenen Nukleinsäuren (DNA, RNA). 2. Probenentnahme, bei der auf den Einsatz von Antikoagulantien vollkommen verzichtet werden kann. 3. Die mit dem beschriebenen Blutentnahmesystem gewonnene Probe kann universell in allen bekannten Nukleinsäure-Isolierungssystemen eingesetzt werden. 4. Das Blutentnahmesystem ist lagerungsstabil.

Zusätzlich wurde überraschenderweise festgestellt, daß die mit dem beschriebenen Abnahmesystem gewonnene Probe in dem Gefäß über längere Zeit ohne Degradation der Nukleinsäuren lagerfähig ist (siehe Beispiele 2, 3, 7, 8).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

### **Beispiel 1:**

Das Blutentnahmesystem kann in einer bevorzugten Ausführungsform folgendermaßen zusammengesetzt sein (s. Abb. 1): Ein Röhrchen wird mit einem definierten Volumen der Nukleinsäure-stabilisierenden Substanz gefüllt, mit einem definierten Vakuum versehen und mit einem Septum verschlossen. Das Septum ist so konstruiert, daß es mit dem gängigen Probenentnahmезubehör (Kanüle usw.) kompatibel ist. Im vorliegenden Beispiel wurden 2,2 ml Reagenz vorgelegt und das Vakuum war so eingestellt, daß bei der Probennahme exakt 2,2 ml Blut zufließen konnten. Die im zufließenden Blutstrom enthaltenen Nukleinsäuren wurden unmittelbar in eine stabile Form überführt.

Allgemeine Vorbemerkung zu den nachfolgenden Beispielen.

Bei allen nachfolgend beschriebenen Beispielen hatte die Nukleinsäure-stabilisierende Substanz (N-sS), falls nicht anders angegeben, folgende Zusammensetzung: 45 mM Tris, 5 M Guanidiniumthiocyanat (GTC), 0,8% (w/v) Dithiothreitol (DTT), 18% (w/v) Triton-X-100, pH 6,0.

In allen beschriebenen Beispielen wurde die Nukleinsäure-stabilisierende Substanz, falls nicht anders angegeben, mit der Probe im Verhältnis 1 zu 1 gemischt (1 Volumen N-sS plus 1 Volumen Probenmaterial). Eine geringere Konzentration von N-sS, z.B. 1 Volumen N-sS plus 5 Volumen Probe, könnte zur Degradation von RNA führen.

Für alle Beispiele wurde Blut dadurch stabilisiert, daß es unmittelbar bei der Entnahme in das mit N-sS versetzte Röhrchen gegeben wurde.

### **Beispiel 2:**

Stabilität von Nukleinsäure nach Mischung von Probenmaterial und N-sS.

Isolierung von RNA und DNA vom Probenlysat mit silikaderivatisierten Oberflächen.

### **Material und Methode:**

Das Probenmaterial für die DNA- und RNA-Isolierung wurde unmittelbar nach der Entnahme, nach Lagerung für 6 Tage bei 4°C und nach Lagerung für 1 Monat bei -20°C verwendet.

Für die Isolierung von RNA (Abb. 2) wurde der HighPure RNA Isolation Kit (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1828 665) verwendet. Die Beipackzettelvorschrift wurde folgendermaßen modifiziert: Ein Volumen von 2,4 ml Probenlysat wurde in 4 Aliquots mit jeweils 600 µl auf die Säule aufgetragen, so daß insgesamt Probenmaterial aus 2,4 ml Lysat aufgetragen wurden. Alle anderen Schritte wurden entsprechend dem Beipackzettel ausgeführt. Die RNA wurde schließlich mit 100 µl Elutionspuffer eluiert.

Zur Isolierung von DNA (Abb. 3) wurde der QiaAmp Blood Kit (Qiagen-Kat.-Nr. 29104) eingesetzt. Die im Beipackzettel beschriebene Standardprozedur wurde in verschiedenen Punkten modifiziert: 400 µl Probenvolumen wurden direkt auf die Säule gegeben, wobei das im Kit enthaltene Bindereagens nicht eingesetzt wurde. 25 µl Proteinase-K-Stocklösung wurden zugefügt und die Probe 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule in ein Sammelgefäß gestellt und wie im Beipackzettel beschrieben zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden, bis auf die Verwendung von Ethanol, wie im Beipackzettel beschrieben durchgeführt. Das Elutionsvolumen war 200 µl.

### **Beispiel 3:**

Isolierung von mRNA aus Probenlysat unter Verwendung von Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln und Biotin-markiertem Oligo(dT) (Abb. 4):

### **Material und Methode:**

20 ml Probenlysat wurden in ein Gefäß gegeben. Die mRNA wurde nach folgender Methode isoliert: Zunächst wurden 30 ml Hybridisierungspuffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 6 nM Biotin-markiertes Oligo(dT), pH 7,4) zum Lysat gegeben. Danach wurden 3 mg Streptavidin-Magnetpartikel (Boehringer Mannheim) zugegeben. Die Probe wurde gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Magnetpartikel wurden mit Hilfe eines Magneten abgetrennt, der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Partikel in Waschpuffer 1 (10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1% Triton-X-100, pH 7,5) resuspendiert und 3 mal mit Waschpuffer 2 (10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen (Waschschritte: Resuspension, magnetische Separation, Entfernung des Überstandes). Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand komplett entfernt und die Partikel wurden in 20 µl dest. Wasser resuspendiert. Die Probe wurde für 5 min. auf 70°C erhitzt. Die Magnetpartikel wurden separiert und der Überstand, der die mRNA enthielt, wurde mittels Gelelektrophorese analysiert.

**Beispiel 4:**

Isolierung der DNA und RNA unter Verwendung einer abgeänderten Vorschrift nach Chomczynski und Sacchi (Analytical Biochemistry 162, 156-159 (1987)) (Beispiel für eine auf Lösungsmittelextraktion basierende Methode) (Abb. 5):

**Material und Methode:**

2 ml Probenvolumen wurden aus dem Blutentnahmegefäß in ein Röhrchen überführt. Danach wurden 0,2 ml einer 2 M Natriumacetat-Lösung, pH 4, 2 ml Phenol (Wasser gesättigt) und 0,4 ml eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (49:1) zugegeben, wobei nach Zugabe jeder Lösung die Probe gründlich gemischt wurde. Die komplette Lösung wurde 10 Sekunden heftig geschüttelt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde 20 Minuten bei 4°C mit 10000 g zentrifugiert. Nach Zentrifugation befand sich die RNA in der wässrigen Phase, die DNA und Proteine in der Zwischen- und Phenolphase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol versetzt. Zur Ausfällung der RNA wurde die Probe für 1 Stunde bei -20°C gelagert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C mit 10000 g befand sich die RNA im Pellet. Dieses wurde in 0,3 ml Puffer (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 0,5% Sarcosyl, 0,1 M 2-Mercaptoisopropanol) aufgenommen, in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei -20°C wurde die Lösung in einer Eppendorf-Zentrifuge 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde in 75% Ethanol aufgenommen und über Zentrifugation (Speed vac) eingengt und getrocknet. Zur weiteren Verarbeitung wurde die Probe in 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 6,5 gelöst.

**Beispiel 5**

Bedeutung von reduzierenden Reagenzien (z.B. DTT) in der Stabilisierungslösung für die Langzeitstabilisierung von RNA

**Material und Methode:**

Verwendete Stabilisierungslösung: 4.0 M GTC; 13.5 % Triton X100; 45 mM Tris/HCl; mit bzw. ohne 120 mM DTT. 700 µl Serum wurden mit 700 µl Stabilisierungslösung gemischt. Nach 2 min Inkubation wurden 20 µl MS2-RNA (0.8 µg/µl von Roche) zugegeben. Die Proben wurden für 180 min bei 40 °C inkubiert und anschließend in Aliquots a 400 µl mit dem High Pure total RNA Kit von Roche aufgearbeitet. Die Proben wurden in einem Schritt ohne Zusatz des Kit-Bindereagens auf die Säule gegeben und nach Anleitung zentrifugiert. Die folgenden Waschschrte und die Elution der RNA in 50 µl Elutionbuffer erfolgten nach Anleitung.

Die Analytik erfolgte mittels Agarosegel (siehe Abb. 6).

Ergebnis: Ohne den Zusatz von reduzierenden Reagenzien zur Stabilisierungslösung kann keine Langzeitstabilisierung von RNA erreicht werden.

### **Beispiel 6**

Stabilität von freier MS2-RNA in Serum. Kinetik des RNA-Abbaus durch Probenkomponenten.

#### **Material und Methode:**

250 µl Serum wurden mit 10 µl MS2-RNA (0.8 µg/µl von Roche) gespiked und bei Raumtemperatur inkubiert. Sofort nach Zugabe der RNA, nach 2 min bis 50 min wurde der natürliche RNA-Abbau in Serum durch Zusatz von 250 µl Stabilisierungslösung abgestoppt. Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Als Standard wurde eine Probe erst nach Zusatz der Stabilisierungslösung zum Serum mit MS2-RNA versetzt und parallel aufgearbeitet.

Alle Proben wurden parallel mit dem High Pure viral RNA-Kit von Roche aufgearbeitet. Die Proben wurden in einem Schritt ohne Zusatz des Kit-Bindereagens auf die Säule gegeben und nach Anleitung zentrifugiert. Die folgenden Waschschrte und die Elution der RNA in 50 µl Elutionspuffer erfolgten nach Anleitung.

20 µl des Eluates wurden mittels eines 1.2 %igen nativen Agarosegels aufgetrennt und analysiert (siehe Abb. 7).

Ergebnis: MS2-RNA ist in Serum nicht stabil. Bereits 2 Minuten nach der Zugabe von RNA zu Serum ist diese vollständig abgebaut. Durch den Zusatz von Stabilisierungslösung zum Serum im Verhältnis 1:1 kann dieser Prozeß sofort abgestoppt und eine Stabilisierung der RNA zum Zeitpunkt der Zugabe der Stabilisierungslösung (=Blutabnahme) erreicht werden.

### Beispiel 7

#### Stabilität von MS2-RNA in Serum/Stabilisierungslösung: Abhängigkeit von der GTC Konzentration

#### Material und Methode

Verwendete Stabilisierungslösungen: 3 - 5 M GTC; 13.5 % Triton X100; 50 mM DTT; 42 mM Tris/HCl

pH der Lösungen: ca. 4.0

pH der Lösungen nach Serumzugabe: ca. 6.7.

2 ml Serum wurden mit 2.5 ml der jeweiligen Stabilisierungslösungen gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 2-5 min wurden 90 µl MS2-RNA (0.8 µg/µl von Roche) zugegeben und bei 40 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 400 µl Probe entnommen und mit dem High Pure total RNA Kit von Roche entsprechend Beispiel 5 aufgearbeitet. Die Proben wurden in 50 µl eluiert und bei - 20 °C eingefroren. Für die Analyse der RNA-Integrität wurden 20 µl des Eluates auf ein 1.5 %iges Agarosegel aufgetragen (s. Abb. 8).

Für die PCR-Analyse der Proben wurden 10 µl des Eluats mittels AMV-RT (Roche) reverse transkribiert und anschließend mittels PCR auf dem Lightcycler analysiert:

Ansatz für RT:	4.0 µl	AMV-RT-Puffer
(42 °C für 1 h)	2.0 µl	dNTP's ( Endkonzentration 10 mM)
	0.5 µl	RNaseinhibitor (Roche, 20 units)
	1.0 µl	Primer 2827 (Endkonzentration 1 µM)
	1.9 µl	DMPC-Wasser
	0.6 µl	AMV-RT (Roche, 15 units)

10 µl      Template-RNA  
20 µl

Die PCR wurde auf dem Lightcycler bei einer Annealingtemperatur von 61 °C unter Verwendung von SYBR-Green als Detektionssystem durchgeführt. Ansatz für PCR:

1.6 µl      MgCl<sub>2</sub> (Stammlsg. 25 mM)  
5.9 µl      DMPC-Wasser  
0.25 µl      Primer 2827 (Stammlsg. 20 mM)  
0.25 µl      Primer 2335 (Stammlsg. 20 mM)  
1.0 µl      SYBR-Green-Mastermix (Roche)  
1.0 µl      RT-Ansatz (1:50 verdünnt)  
10 µl

Das Amplifikat der PCR wurde vollständig auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 9).

#### Ergebnis:

RNA-Integrität nach 3 Tagen bei 40 °C:

Das Agarosegel in Abb. 8 zeigt 20 µl der eluierten MS2-RNA nach 3 Tagen Inkubation bei 40 °C. Nach diesem Zeitraum sind in Abhängigkeit vom GTC-Gehalt deutliche Unterschiede in der RNA-Integrität zu erkennen. Demnach ist ein Salzgehalt kleiner 2 M in der Serum/Stabilisierungslösung für die Integrität der RNA von Vorteil.

Amplifizierbarkeit der RNA nach 8 Tagen bei 40 °C:

Obwohl bereits nach 3 Tagen bei 40 °C eine beginnende Degradierung der RNA festgestellt wurde, konnten alle RNA-Proben nach einer Inkubation von 8 Tagen bei 40 °C amplifiziert und eindeutig nachgewiesen werden.

Das Amplifikat der PCR wurde vollständig auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 9).



**Beispiel 8**

Stabilität von MS2-RNA in Serum/Stabilisierungslösung: Abhängigkeit vom pH-Wert der mit Stabilisierungslösung versetzten Probe.

**Material und Methode**

Verwendete Lösung:	4 M (5 M)	GTC
	14.4 %	Triton X 100
	50 mM	DTT
	45 mM	Tris/HCl

pH nach Serumzugabe zwischen 6.7 und 8.0

2.5 ml Stabilisierungslösung wurden mit 2.0 ml Serum gemischt. Nach Zusatz von 90 µl MS2-RNA (0.8 µg/µl, Roche) wurden die Proben bei Raumtemperatur inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die RNA aus 500 µl Probe mit dem Roche viral RNA Kit entsprechend Bsp. 6 aufgearbeitet und in 50 µl Elutionspuffer isoliert. 20 µl des Eluates wurden mittels Agarosegel analysiert (siehe Abb. 10).

**Ergebnis:**

Der pH der Serum/Stabilisierungslösung und damit auch der pH und Pufferbereich der Stabilisierungslösung ist für die Langzeitstabilisierung von RNA entscheidend. Während bei einem pH-Wert von 8.0 bereits nach 2 Tagen keine intakte RNA mehr nachgewiesen werden konnte, ist in einem pH-Bereich zwischen 6.6 und 7.0 noch nach 13 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur intakte RNA nachweisbar. Neben dem pH-Wert ist jedoch auch eine optimal eingestellte GTC-Konzentration für die Langzeitstabilisierung von RNA von Bedeutung (siehe auch Bsp. 7). Das dargestellte Bsp. verdeutlicht, dass fuer eine Langzeitstabilisierung von RNA eine GTC-Endkonzentration in der stabilisierten Probe von 2.2 M GTC besser ist als 2.78.

**Legenden**

**Abb. 1:**

Probenentnahmegefäß mit N-sS, definiertem Vacuum, mit Septum versiegelt.

**Abb. 2:**

Gelanalyse (1% Agarose) von RNA, die im Probeentnahmegefäß unterschiedlich lange gelagert wurde. Spalte 1: Isolierung unmittelbar nach Probenentnahme (keine Lagerung), Spalte 2: Lagerung für einen Monat bei -20°C, Spalte 3: Lagerung für 6 Tage bei 4°C. Die Menge der aufgetragenen RNA entsprach einem Blutvolumen von 120 µl.

**Abb 3:**

Gelanalyse (1% Agarose) von DNA, die im Probeentnahmegefäß unterschiedlich lange gelagert wurde. Spalte 1: Isolierung unmittelbar nach Probenentnahme (keine Lagerung), Spalte 2: Lagerung für einen Monat bei -20°C, Spalte 3: Lagerung für 6 Tage bei 4°C. Die Menge der aufgetragenen DNA entsprach einem Blutvolumen von 10 µl.

**Abb. 4:**

Gelanalyse (1% Agarose) von mRNA, die aus 10 ml Blut isoliert wurde (Spalte 2). Molekulargewichtsmarker (Spalte 1). Zusätzlich zur mRNA sind die rRNA Banden sichtbar. Die scharfen Konturen der Banden beweisen die Integrität der Nukleinsäuren.

**Abb. 5:**

Gelanalyse (1% Agarose) der RNA, die aus 120 µl Blut isoliert wurde.

**Abb. 6:**

Gelanalyse von isolierter MS2-RNA nach Inkubation in Serum/Stabilisierungslösung mit/ohne DTT für 180 min bei 40 °C.

Spalte 1: Positivkontrolle: MS2-RNA, Spalte 2: DNA-Marker, Spalte 3,4,5: MS2-RNA nach Inkubation mit DTThaltiger Stabilisierungslösung, Spalte 6,7,8: MS2-RNA nach Inkubation mit Stabilisierungslösung ohne DTT

**Abb. 7:**

Gelanalyse von isolierter MS2-RNA nach Inkubation in Serum für 0-50 min

Spalte 10,17: MS2-RNA-Standard, Spalte 9,16: DNA-Marker, Spalte 7,8: Inkubation für 0 min, Spalte 5,6: Inkubation für 2 min, Spalte 3,4: Inkubation für 5 min, Spalte 1,2: Inkubation für 10 min, Spalte 11,12: Inkubation für 15 min, Spalte 13,14: Inkubation für 30 min, Spalte 15: Inkubation für 50 min

**Abb. 8:**

Gelanalyse von MS2-RNA, die nach Inkubation in Serum/Stabilisierungslösung für 3 Tage bei 40 °C isoliert wurde. Der GTC-Gehalt der Stabilisierungslösung nach Serumzugabe, in welcher die betreffende RNA-Probe inkubiert wurde, ist in der entsprechenden Spalte angegeben.

Spalte 1: 2.70 M GTC, Spalte 2: 2.5 M GTC, Spalte 3: 2.36 M GTC, Spalte 4: 2.20 M GTC, Spalte 5: 2.08 M GTC, Spalte 6: 1.94 M GTC, Spalte 7: 1.80 M GTC, Spalte 8: 1.66 M GTC.

**Abb. 9:**

Gelanalyse der PCR-Amplifikate von MS2-RNA, welche nach 1 bzw. 8 Tagen Inkubation bei 40 °C in Serum/Stabilisierungslösung isoliert wurde.

Spalte 1: Amplifikat der nach 1 Tag isolierten RNA, Spalte 2: Amplifikat der nach 8 Tagen isolierten RNA, Spalte 3: DNA-Marker, Spalte 4: MS2-RNA-Positivkontrolle: 0.8 µg in 10 µl RT, 1:50 verdünnt, 1 µl amplifiziert

**Abb. 10:**

Gelanalyse von isolierter MS2-RNA nach 6 (Spalte 2-12) bzw. 13 (Spalte 14-19) Tagen Inkubation bei Raumtemperatur in Serum/Stabilisierungslösung. Hinter den betreffenden Spalten steht der pH-Wert, welcher nach Mischung von Serum und Stabilisierungslösung erreicht wurde.

Spalte 1, 13, 20: DNA-Marker, Spalte 2: pH 8.0, Spalte 3: pH 7.7, Spalte 4: pH 7.5, Spalte 5: pH 7.35, Spalte 6: pH 7.18, Spalte 7, 14: pH 7.07, Spalte 8, 15: pH 6.94, Spalte 9, 16: pH 6.8, Spalte 10, 17: pH 6.72, Spalte 11, 18: pH 6.68 und Spalte 12, 19: pH 6.7 Die Stabilisierungslösung der RNA in Spalte 12, 19 hatte den gleichen pH-Wert wie die der RNA in Spalte 11, enthielt aber 5 M GTC anstelle von 4 M.

Patentansprüche

1. Gefäß zur Blutentnahme, enthaltend eine wäßrige Lösung mit folgenden Bestandteilen:
  - ein Guanidiniumsalz;
  - eine Puffersubstanz;
  - ein Reduktionsmittel und/oder
  - ein Detergenz.
2. Gefäß nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Guanidiniumsalz ausgewählt wird aus Guanidiniumthiocyanat und Guanidiniumchlorid.
3. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Guanidiniumsalz in einer Konzentration von 1 bis 8,0 M, vorzugsweise 2,5 bis 8,0 M vorliegt.
4. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz ausgewählt wird aus Tris, HEPES, MOPS, Citrat- und Phosphatpuffer.
5. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz in einer Konzentration von 10 bis 300 mM vorliegt.
6. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergenz ausgewählt wird aus Triton-X-100, NP-40, Polydocanol und Tween 20.
7. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergenz in einer Konzentration von 5 bis 30 Gew.% vorliegt.

8. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Reduktionsmittel ausgewählt wird aus Dithiothreitol,  $\beta$ -Mercaptoethanol und TCEP.
9. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Reduktionsmittel in einer Konzentration von 0,1 bis 10,0 Gew.% vorliegt.
10. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der pH der Lösung zwischen 4,0 und 7,5 liegt, vorzugsweise zwischen 4,0 und 6,5.
11. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung folgende Bestandteile enthält:
  - 4 M Guanidiniumthiocyanat;
  - 45 mM Tris/HCl;
  - 15 % (w/v) Triton-X-100;
  - 0,8 % (w/v) DTT,wobei der pH bei 6,0 liegt.
12. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Unterdruck im zur Blutaufnahme vorgesehenen Raum aufweist.
13. Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es entnommenes Blut enthält.
14. Verfahren zur Entnahme von Blut, umfassend den Schritt des unmittelbaren Einbringens des Bluts in ein Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 13.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Blutmenge entnommen wird, die dem 0,1 bis 4-fachen Volumen der Lösung in dem Gefäß entspricht.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Endkonzentration des Guanidiniumsalzes nach Blutzufuhr zwischen 1,0 M und 5 M liegt, vorzugsweise 1,5 und 5 M .
17. Verfahren zur Stabilisierung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren aus Blut, umfassend den Schritt des Einbringens von Blut in ein Gefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 13 und gegebenenfalls Isolierung der Nukleinsäuren mit herkömmlichen Verfahren.
18. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Lösung so eingestellt ist, daß nach Zugabe des Probenmaterials ein pH-Wert zwischen 4,0 und 7,5 erreicht wird.
19. Verwendung des Gefäßes nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Entnahme von Blut, vorzugsweise beim Menschen.
20. Verwendung einer Lösung, enthaltend ein Guanidiniumsalz, eine Puffersubstanz, ein Detergenz und/oder ein Reduktionsmittel in einem Gefäß zur Entnahme von Blut.
21. Stabilisierte Blutprobe erhältlich durch Einbringen von Gesamtblut in ein Gefäß nach einem der Ansprüche 1-13.
22. Blutprobe nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen pH-Wert von 4.0 bis 7.5, vorzugsweise von 6.6 bis 7.0 aufweist.
23. Blutprobe nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie von Humanblut stammt.

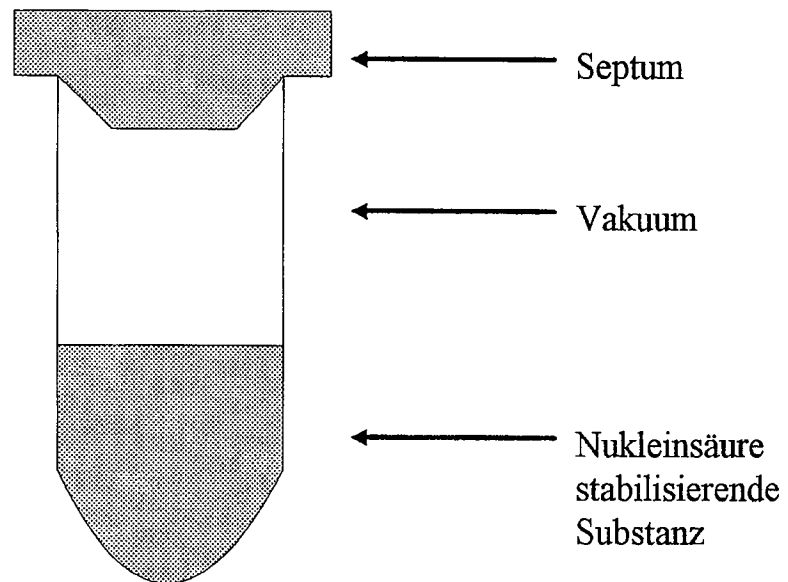


Abb. 1



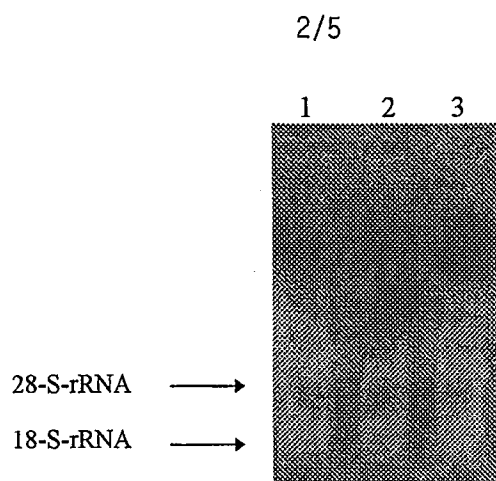


Abb. 2

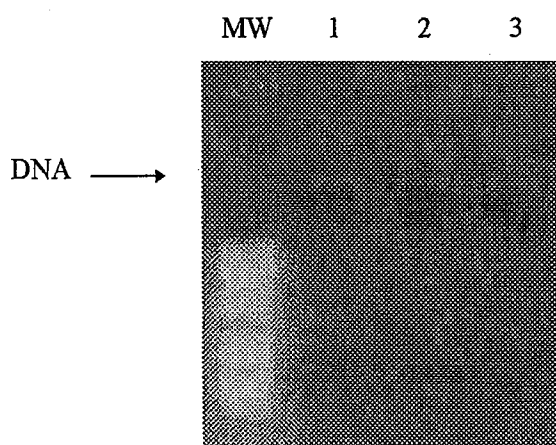


Abb. 3

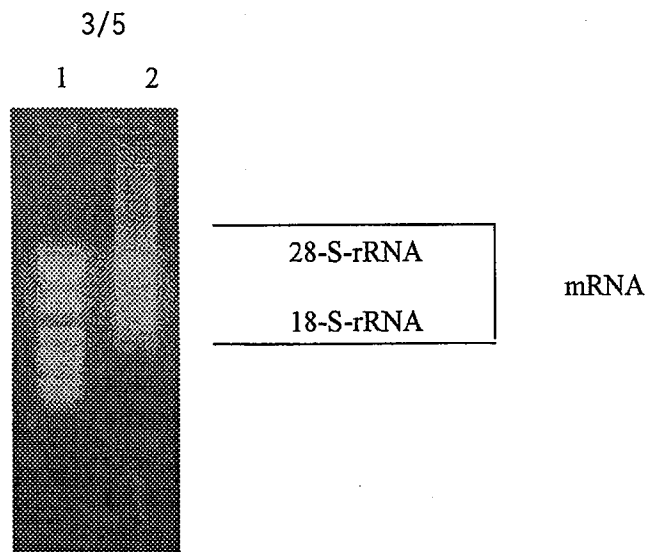


Abb. 4

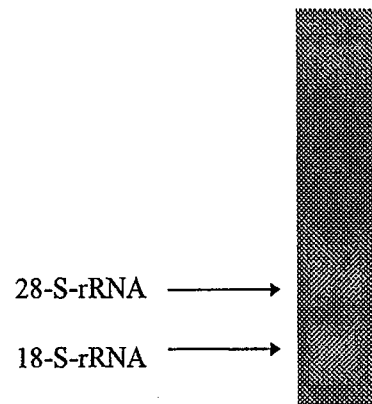


Abb. 5

4/5

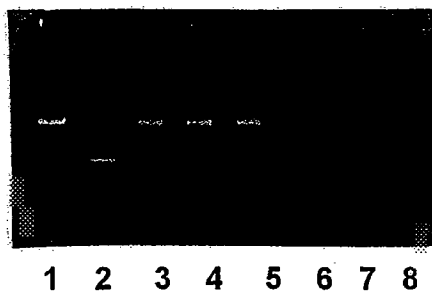


Abb. 6

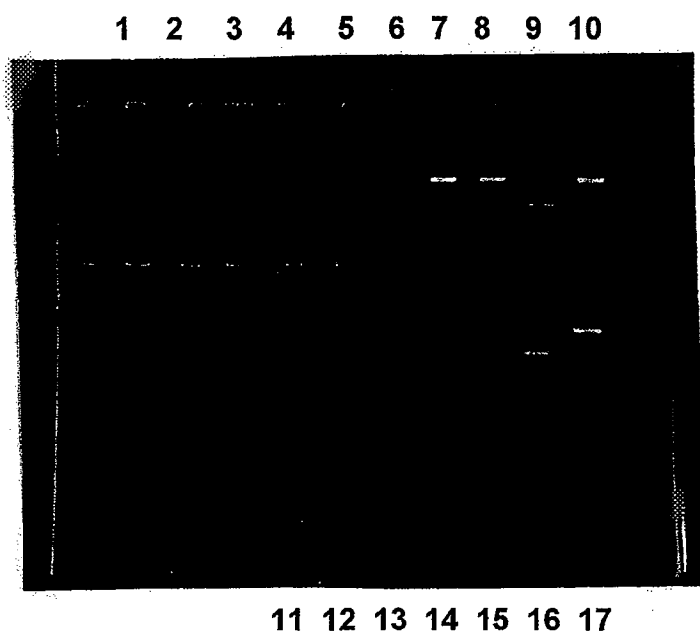


Abb. 7

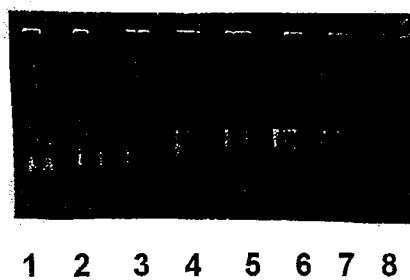
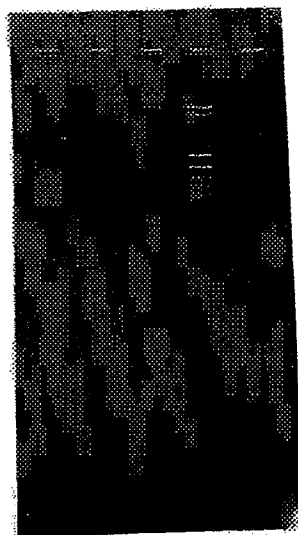


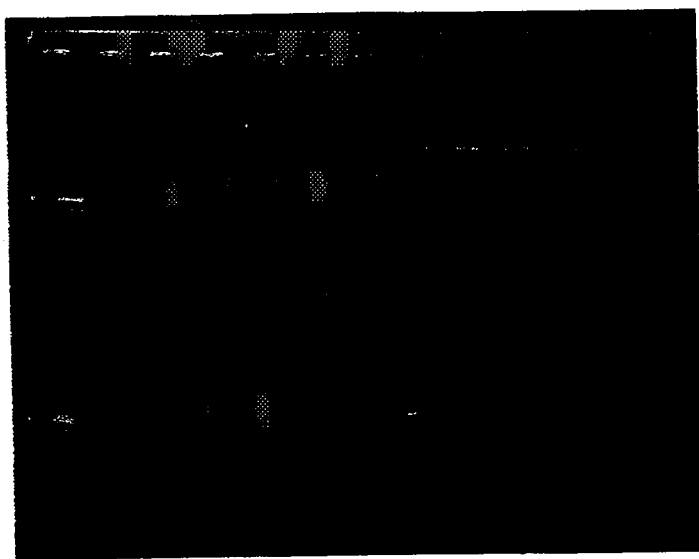
Abb. 8



1 2 3 4

Abb. 9

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



13 14 15 16 17 18 19 20

Abb. 10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05857

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 A61B5/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 818 542 A (LABORDIAGNOSTIKA GESELLSCHAFT MBH) 14 January 1998 (1998-01-14) the whole document ---	1-23
A	EP 0 554 034 A (CHOMCZYNSKI, P.) 4 August 1993 (1993-08-04) claims 1-12 ---	1-11,17
A	LOZANO, M.E. ET AL.: "A simple nucleic acid amplification assay for the rapid detection of Junin virus in whole blood samples" VIRUS RESEARCH, vol. 27, 1993, pages 37-53, XP002900733 page 40 --- -/--	1-5,17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 1999

Date of mailing of the international search report

29. 12. 99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mosser

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter      nal Application No

PCT/EP 99/05857

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 13, 28 March 1988 (1988-03-28) Columbus, Ohio, US; abstract no. 109113p, MAC DONALD, R.J. ET AL.: "Isolation of RNA using guanidinium salts" page 324; column 1; XP002900734 abstract &amp; METHODS ENZYMD., vol. 152 (Guide Mol. Cloning Tech), 1987, pages 219-227, -----</p>	1,2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 99/05857

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14-20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Patent Claims 14-20 can relate to diagnostic methods which are conducted on the human or animal body (See PCT Rule 39.1(iv)), these claims were searched.

2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**☐  
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05857

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 818542 A	14-01-1998	AT 1082 U	25-10-1996
EP 554034 A	04-08-1993	US 5346994 A	13-09-1994
		AT 144777 T	15-11-1996
		DE 69305662 D	05-12-1996
		DE 69305662 T	27-02-1997
		ES 2095565 T	16-02-1997
		JP 2679929 B	19-11-1997
		JP 5344886 A	27-12-1993



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12Q1/68 A61B5/15

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12Q A61B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 818 542 A (LABORDIAGNOSTIKA GESELLSCHAFT MBH) 14. Januar 1998 (1998-01-14) das ganze Dokument	1-23
A	--- EP 0 554 034 A (CHOMCZYNSKI, P.) 4. August 1993 (1993-08-04) Ansprüche 1-12	1-11,17
A	--- LOZANO, M.E. ET AL.: "A simple nucleic acid amplification assay for the rapid detection of Junin virus in whole blood samples" VIRUS RESEARCH, Bd. 27, 1993, Seiten 37-53, XP002900733 Seite 40	1-5,17
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. November 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29. 12. 99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mosser

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 13, 28. März 1988 (1988-03-28) Columbus, Ohio, US; abstract no. 109113p, MAC DONALD, R.J. ET AL.: "Isolation of RNA using guanidinium salts" Seite 324; Spalte 1; XP002900734 Zusammenfassung &amp; METHODS ENZYMD., Bd. 152 (Guide Mol. Cloning Tech), 1987, Seiten 219-227, -----</p>	1,2

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05857

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 14-20  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung:** Obwohl die vorliegenden Patentansprüche 14-20 Diagnostizierverfahren betreffen können, die am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen werden (siehe PCT-Regel 39.1(iv)), wurden diese Ansprüche recherchiert.
2. ☐ Ansprüche Nr.   
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.   
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05857

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 818542	A	14-01-1998	AT	1082 U	25-10-1996
-----					
EP 554034	A	04-08-1993	US	5346994 A	13-09-1994
			AT	144777 T	15-11-1996
			DE	69305662 D	05-12-1996
			DE	69305662 T	27-02-1997
			ES	2095565 T	16-02-1997
			JP	2679929 B	19-11-1997
			JP	5344886 A	27-12-1993
-----					